

RESEARCH ARTICLE

다양한 배양 환경에 따른 국내 수집 외생균근성 *Tricholoma*속 종의 균사생장 특성

강정아^{1,3}, 가강현², 김준영^{1,3}, 김성환^{1,3*}

¹단국대학교 미생물학과, ²국립산림과학원 산림소득자원연구과, ³단국대학교 생물다양성 연구소

Mycelial Growth Properties of Domestically Collected Ectomycorrhizal *Tricholoma* Mushrooms in Various Culture Conditions

Jung-A Kang^{1,3}, Kang-Hyeon Ka², Jun Young Kim^{1,3}, Seong Hwan Kim^{1,3*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Science, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

²Special Forest Products Division, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

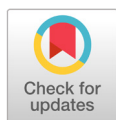
³Institute of Biodiversity, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

*Corresponding author: piceae@dankook.ac.kr

ABSTRACT

The ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma* is one of mushroom groups that cannot be cultivated artificially. To use this mushroom as applicable resource for food production, it is necessary to obtain information about their mycelial growth properties in various environmental conditions. This study investigated the mycelial growth of four domestic isolates of *Tricholoma* species (*T. bakamatsutake*, *T. fulvocastaneum*, *T. matsutake*, *T. terreum*) at different physical and chemical conditions. The optimal physical conditions for their mycelia growth were found to be a temperature range of 20~25°C and a pH range of 4.0~7.0 in dark condition. The growth of *T. matsutake* was retarded at high temperature (30°C). Tests to determine the chemical factors that affected mycelial growth showed that the four *Tricholoma* spp. grew 1% saline. *T. matsutake* grew in up to 2% saline. In the presence of various heavy metals (50 ppm) and pesticides (suppliers' recommended concentration), mycelial growth was inhibited the most by cadmium and emamectin benzoate, respectively. However, all the four *Tricholoma* spp. grew with Cu⁺. The growth of *T. matsutake* was not inhibited by abamectin, acetamiprid, and thiacloprid. Extracellular enzyme activities of amylase and β-glucosidase were detected only in *T. bakamatsutake* and *T. fulvocastaneum*. The results of the present study allowed us to determine suitable or harmful environmental conditions for the mycelial cultivation of the *Tricholoma* spp.

Keywords: Ectomycorrhizal fungi, Mycelial growth properties, *Tricholoma* spp.



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2018 September, 46(3): 271-280
<https://doi.org/10.4489/KJM.20180037>

Received: August 11, 2018

Revised: August 28, 2018

Accepted: August 28, 2018

© 2018 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

산림 내에는 고사한 나무에 부생하거나 생목에 기생하는 것에서부터 식물과 공생관계에 있는 것까지 다양한 균류가 분포하고 있다. 이 중에 수목 뿌리의 피층세포 간극에 침입해 성장하면서 외생균근을 형성하고 땅 위 또는 땅 속에 자실체를 형성하는 외생균근성 균류도 존재한다[1]. 식물 종의 약 3%가 뿌리에 수천 종의 균류와 외생균근을 형성하는 것으로 알려져 있는데, 여기에는 목본성인 소나무과(Pinaceae), 자작나무과(Betulaceae), 참나무과(Fagaceae) 등의 식물을 주로 포함하고 있다[2, 3]. 식물과 공생하는 균류는 주로 담자균문, 자낭균문에 속하며 일부는 접합균문도 발견되고 있다[4]. 담자균문 중 국내 산림에서 발생하는 식용 혹은 약용 버섯으로 이용되는 송이(*Tricholoma matsutake*), 향버섯(*Sarcodon aspratus*) 등이 여기에 속하며, 이와 같은 버섯들은 여러 나라에서 중요한 임산물로 주목 받아오고 있다[5].

송이버섯에 대한 관심은 오래 전부터 있어 왔는데, 특히 아시아 지역에서는 인공배양의 필요성이 대두되어 동아시아 지역을 기점으로 연구가 활발하게 이루어져 왔다[5, 6]. 그리고 송이버섯의 자실체 발생을 유도, 촉진하는 외부 환경인자는 온도, 습도, 수분, 가스 조성, 광, 미생물의 작용, 화학물질 및 영양조건의 변화 등으로 알려져 있다[7]. 균의 자연 생식에 대한 지식의 이해는 송이버섯을 보호하고 소나무 숲 내 풍부도를 높이는 데 필수적이다[7]. 즉, 최종적으로 송이버섯의 인공 재배를 위해서는 다양한 환경 조건 처리들을 규명하는 연구가 필수적이라고 할 수 있다.

본 연구는 국내에서 자생하고 식용 및 약용으로 사용되어 상업적으로 가치가 높은 외생균근성 버섯류의 자실체에서 분리한 균사체의 이용 가능성에 대한 정보를 얻고자 4종의 송이(*Tricholoma*)속 균주에 대해 다양한 환경(pH, 온도, 광, 염농도, 중금속, 살충제)에서 균사를 배양하여 생장 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

공시 균주 및 배양 조건

본 연구에 이용된 균주는 *Tricholoma bakamatsutake*(가송이), *T. fulvocastaneum*(구실잣밤나무송이, 가칭), *T. matsutake*(송이), *T. terreum*(땅송이) 등 이다(Fig. 1, Table 1). 네 가지의 송이속 균주는 국내 야생 산림에서 자생한 버섯의 자실체 조직으로부터 순수 분리된 것으로 국립산림과학원(National Institute of Forest Science, NIFoS)에서 제공받았다. 분양 균주의 진위여부 확인을 위해 셀로판을 깬 potato dextrose agar (PDA)에 배양 후 균사를 수거하여 Kim 등[8]의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하고 PCR을 수행하여 internal transcribed spacer (ITS) region을 증폭하였다. 증폭된 DNA의 염기서열분석은 마크로젠(Macrogen, Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행하였고 얻어진 염기서열은 미국 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank DNA 데이터베이스에 등록된 *Tricholoma* 진균의 염기서열을 웹 Blast program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)으로 검색하여 유사도를 확인하였다. 분석된 4종은 *T. terreum* voucher C 59300 (EU653300), *T. matsutake* (AB559004) 등과 각각 100% 염기서열 유사도를 나타내어 분자생물학적으로 동종의 균들임을 재확인하고 균사생장 실험에 사용하였다. 이들의 분석된 ITS region 염기서열은 GenBank에 등록하였으며 등록번호는 Table 1에 제시하였다.

균주의 증식 및 배양 실험을 위해서는 PDA (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA)를 외생균근균 생

장에 최적 조건으로 알려진 pH 6으로 배지를 조정한 후 90 mm 직경 페트리 접시 에 25 mL씩 정량 분주하여 제작하였다. 균주 접종은 접종할 균의 균총 가장자리 부분을 6 mm 직경의 cork borer를 이용해 절단하여 얻어진 아가 조각을 접종원으로 사용하였다. 다양한 환경조건에서 처리된 균주의 균사생장 비교 시험은 모두 25°C 배양기에서 6주간 배양한 후 수행하였다. 균사생장 측정은 digimatic caliper (Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 이용하여 페트리 접시 뒷면으로 보이는 균총의 가로, 세로 직경 길이를 측정하였다. 측정된 두 값의 합을 평균한 값에 처음 균을 접종할 때 쓰인 6 mm의 접종원 길이의 값을 제외하고 계산 처리를 하여 최종적으로 균사생장 길이 결과값을 얻었다. 실험은 5반복으로 수행하였다.

다양한 환경요인 처리

4종의 송이속 균주의 물리적인 요인에서의 성장 특성을 알기 위해 온도는 10, 15, 20, 25, 30°C 조건, pH는 4, 5, 6, 7, 8 조건, 광은 형광등 조사 유무 조건에 각각 처리하여 배양 후 균사생장을 측정 비교 하였다. pH 조건 배지는 pH 측정기(istek, Seoul, Korea)를 이용해 PDA 배지가 pH 4, 5, 6, 7, 8 조건 이 되도록 1 N-Hydrogen chloride standard solution (Daejung Chemicals & Metals, Siheung, Korea) 과 1 N-Sodium hydroxide standard solution (Daejung Chemicals & Metals)을 넣어 맞추었고 멸균 후

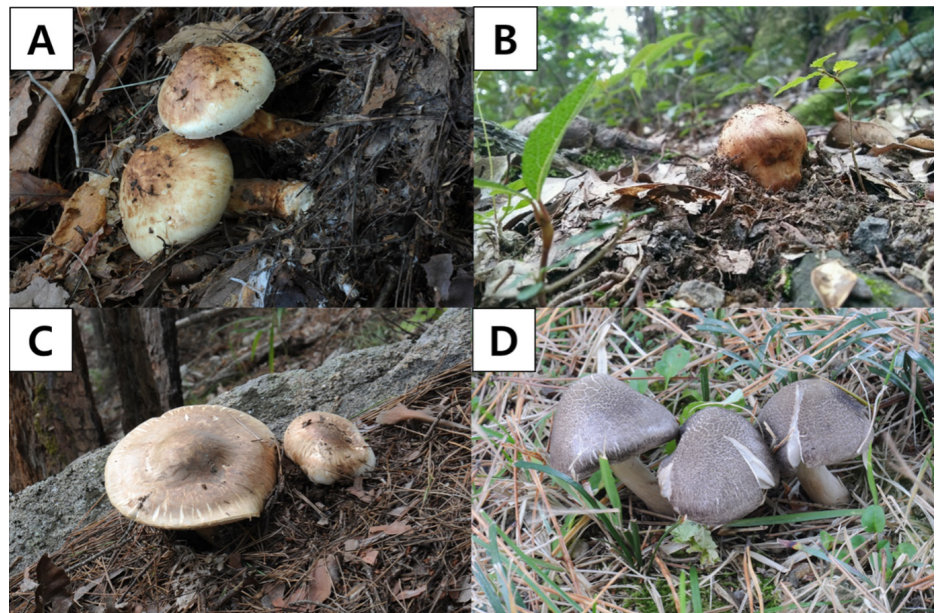


Fig. 1. Photos of the fruiting bodies of the four *Tricholoma* species collected in Korea and employed for the isolation of the cultures used for this study. A, *Tricholoma bakamatsutake*; B, *T. fulvocastaneum*; C, *T. matsutake*; D, *T. terreum*.

Table 1. Fungal strains used in this study

Species	Source	Collection site	GenBank accession No. of the ITS sequence
<i>T. bakamatsutake</i>	NIFoS 2236	Hongcheon, Gangwondo	MF421111
<i>T. fulvocastaneum</i>	NIFoS 3095	Seogwipo, Jeju	MF421112
<i>T. matsutake</i>	NIFoS 1681	Hongcheon, Gangwondo	MF421113
<i>T. terreum</i>	NIFoS 1268	Seoul	MF421114

ITS, internal transcribed spacer; NIFoS, National Institute of Forest Science.

pH 시험지를 사용하여 pH를 다시 확인하였으며 필요하면 배지가 굳기 전에 다소 조정하여 맞추었다. 광 조사 실험에서 암 조건 처리는 알루미늄 호일로 배지 전체를 감싸주어 빛을 차단하였고, 광 조건 처리는 형광등이 장착된 배양기(DS-11BL; Dasol Scientific Co., Hwaseong, Korea)에서 빛을 차단하지 않은 채 25°C와 1,300 lux의 광이 계속 유지되도록 배양하였다. 처리한 각 물리적 요인에 따른 최적 성장 환경을 확인한 후 그 결과를 활용하여 온도와 pH, 암조건 등을 화학적 요인에서의 성장 특성을 알기 위한 실험에 적용하였다. 화학적 환경 요인에 대한 조건 설정은 국내 산림 토양에 존재할 수 있는 것으로서 염분, 중금속, 그리고 농약을 대상으로 배지 조제 시 섞어주어 균사생장을 조사하였다. 염분 환경 실험에서는 염화나트륨(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0% 농도로 사용하였고, 중금속 이온은 비소, 카드뮴, 구리, 납, 아연(As, Cd, Cu, Pb, Zn) 등 5가지 이온이 각각 함유되어 있는 1,000 ppm 표준용액(Kanto Chemical, Tokyo, Japan)을 이용해 50 ppm 농도의 환경을, 농약은 산림에서 소나무재선충병의 예방 및 방제를 목적으로 사용되고 있는 Abamectin 1.8% (Romectin; YouWon EcoScience, Yongin, Korea), Acetamiprid 8% (Mospilan; Kyungnong, Seoul, Korea), Emamectin benzoate 2.15% (Eipam; Syngenta Korea, Seoul, Korea), Thiacloprid 10% (Calypso; Bayer Crop Science, Seoul, Korea) 4종류 농약을 각각 배지에 농약 사용 시 회사에서 권장하는 용액의 희석 농도가 되게 첨가하여 사용하였다. 접종된 송이버섯균은 25°C에서 6주 동안 배양하면서 1차적으로 육안으로 균총의 크기를 비교하였으며, 2차적으로는 각 조건마다 결과 처리를 달리하였다. 농약 조건은 앞선 실험과 마찬가지로 균총의 지름(mm)을 측정 후 접종원을 제외한 수치를 측정하여 처리 조건 간의 결과를 비교하였다. 염 조건에서의 균사생장 조사는 육안으로 고체 배지에 접종된 접종원 외 균사의 생장이 있었는지를 판단하여 내염성 정도를 측정하였다. 중금속 이온 조건 실험은 무처리 대조군(control)의 균총 크기와 대조하여 균사가 성장하지 못하면 -, 대조군 대비 1/3까지 성장하면 +, 대조군 대비 1/3 에서 2/3까지 성장하면 ++, 대조군 대비 2/3에서 대조군 만큼 성장하면 +++ 로 구분하여 균사생장 정도를 비교 평가하였다.

세포외효소 활성 검정

세포외효소 활성 검정은 avicelase, amylase, β -glucosidase, CM-cellulase, xylanase, pectinase, protease 등 7가지 종류의 효소를 chromogenic plate assay 기법으로 수행하였다[9]. 배지 제작은 0.1% yeast nitrogen base without amino acid (Sigma-Aldrich)를 동일한 질소원으로 이용하고 각각의 기질에 따른 효소반응을 진행을 위해서는 0.5%의 다른 탄소원을 이용하였다. 기질탄소원으로서 avicelase는 avicel (Sigma-Aldrich), β -glucosidase는 D-cellobiose (Sigma-Aldrich), amylase는 starch from potato (Sigma-Aldrich), CM-Cellulase는 carboxymethylcellulose sodium salt (Sigma-Aldrich), pectinase는 polygalacturonic acid (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), xylanase는 xylan (Sigma-Aldrich)을 각각 이용하였다. 발색반응(chromogenic reaction)을 위한 염색기질은 0.5% Congo red (Sigma-Aldrich)를, 고체화 시키기 위해서 1.5% bacto agar (Difco, Detroit, MI, USA)를 함께 첨가해 제작하였다. Protease 경우는 10% Skim milk (Fluka; Honeywell Specialty Chemicals, Seelze, Germany)와 2% bacto agar (Difco)를 이용하였다. 제작한 효소 배지의 중앙에 실험균을 접종한 후 25°C 배양기에서 6주 동안 배양 후 효소활성으로 인하여 배지 전체 혹은 균총 주변에 색상이 변한 투명한(clear zone)의 존재를 조사하였다. 결과는 효소 배지에 반응이 확인된다면 “+”, 무반응이라면 “-”로 표기하였다.

결과 및 고찰

현재 우리나라는 지구온난화로 인하여 온대지방에서 아열대지방으로 기온이 점차 오르고 있는 추세이다. 그러므로 그에 맞게 고온에서도 생장이 가능한 버섯자원이 무엇인지 자료가 필요하다. 본 연구에서 30°C의 높은 온도에서도 생장이 가능한 종으로 *T. bakamatsutake*, *T. fulvocastaneum*, *T. terreum*가 확인이 되었다. 공시된 4종의 송이속 균주의 최적 균사생장 온도는 *T. terreum*가 20~25°C, 나머지 3종은 모두 25°C이었다(Fig. 2, Table 2). 최적 생장 온도 조건에서 *T. bakamatsutake*, *T. fulvocastaneum*, *T. matsutake* 등은 균층에 이랑을 나타내었고 이랑의 수량은 *T. matsutake*가 더 세분된 형태로 많이 나타내었다. *T. terreum*의 균층에서는 이랑 형태가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 10°C에서 *T. terreum*균

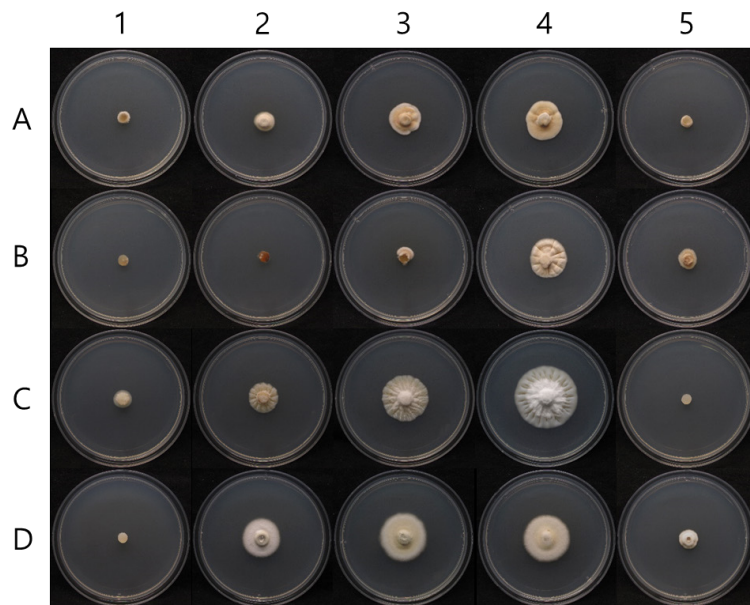


Fig. 2. Colony morphology of *Tricholoma* spp. grown on potato dextrose agar at different temperature conditions. A, *T. bakamatsutake*; B, *T. fulvocastaneum*; C, *T. matsutake*; D, *T. terreum*; 1, 10°C; 2, 15°C; 3, 20°C; 4, 25°C; 5, 30°C.

Table 2. Mycelial growth of *Tricholoma* species on PDA at different physical environmental conditions

Conditions		<i>T. bakamatsutake</i>	<i>T. fulvocastaneum</i>	<i>T. matsutake</i>	<i>T. terreum</i>
Temperature	10°C	2.9±0.2	2.7±0.1	7.3±0.1	NG
	15°C	7.8±0.2	3.4±0.2	15.2±0.0	22.2±0.5
	20°C	16.3±1.3	9.7±0.3	24.1±1.0	27.4±0.6
	25°C	19.5±0.5	16.2±1.7	28.5±0.2	27.2±1.9
	30°C	3.6±0.2	8.5±0.5	NG	8.8±0.5
pH	pH 4	8.8±0.8	25.5±1.2	28.9±0.2	18.2±0.8
	pH 5	21.2±1.5	26.0±2.3	35.9±0.6	25.4±0.4
	pH 6	21.6±1.0	20.3±2.7	32.4±1.5	25.6±1.6
	pH 7	20.6±1.2	3.5±1.3	26.7±1.1	27.3±1.1
Light / dark	pH 8	18.4±0.5	NG	15.1±1.4	25.5±0.4
	light	7.3±1.7	2.4±0.3	19.4±1.2	14.9±1.3
	dark	13.9±0.7	21.7±1.3	31.9±0.7	27.2±2.6

PDA, potato dextrose agar; NG, no growth (0.0±0.0).

Mycelia length = mm.

은 균사가 전혀 성장하지 못하였다. *T. fulvocastaneum*는 10~15°C에서도 생장이 매우 불량하였다. 4종 공시 균주 모두 25°C 조건에서 다른 온도에 비해 균사생장이 최고로 나타났는데 이 중에서 *T. matsutake*의 생장이 가장 우수하였다. 그런데 놀랍게도 *T. matsutake*는 30°C에서 4종 중에서 유일하게 생장을 하지 못하였다. 이는 이 균이 온도변화에 매우 민감한 종임을 보여준다. 국내의 송이 축제의 대상인 *T. matsutake*의 시진이 여름기온이 아닌 9월에서 10월에 이루어지는 것을 보면 이 균의 자실체 형성에 있어서도 온도 조건이 매우 중요한 요인으로 생각된다. 국내의 자연송이 생산이 줄어들고 있는 사정과 연관 지어서 기후변화에 따른 온난화 영향이 *T. matsutake*의 성장 환경에 미치는 연구가 필요하다고 생각된다.

서로 다른 pH 조건에서 최적 균사생장은 *T. bakamatsutake*의 경우는 pH 5~7, *T. fulvocastaneum*는 pH 4~5, *T. matsutake*는 pH 5, *T. terreum*는 pH 6~7 로 각각 나타났다. *T. fulvocastaneum*는 pH 7에서 생장이 극히 불량하였고 pH 8에서 전혀 성장하지 못하였다. 1994년 이후 모니터링을 통해 국내의 여러 광역에서 조사된 산림토양의 pH는 지속적으로 조금씩 감소하여 왔는데 2015년의 경우 평균 pH는 4.88로 측정 되었다[10]. 이러한 자료는 계속해서 국내 산림토양이 산성화 할 것을 예견케 하고 있다. 석회를 투입하여 토양 산도를 높이려는 시도가 이루어지고 있지만 그 효과는 아직 미약한 실정이다. 이러한 사안을 고려할 때 본 연구에서 보여진 4종 송이속 균주의 pH 조건에 따른 균사생장 결과는 현재의 국내 토양조건이 이들 버섯균에게 매우 적합한 환경이라고는 볼 수 없을 것 같다. 국내에 이들 종에 대한 산림생태적 연구자료가 미미한 바 산림 내 유전자원의 보존을 위해서는 생태적 연구가 시급히 시행되어야 할 것이다.

광의 유무에 따른 균사생장을 조사한 결과 4종 송이속 균주 모두 광 배양 조건 보다는 암 배양 조건에서 균사생장이 우수하였다. 암 배양 조건에 비해 광 배양 조건에서 *T. bakamatsutake*, *T. matsutake*, *T. terreum*는 균사생장이 30~50% *T. fulvocastaneum*는 특히 광에 민감하여 균사생장이 85% 이상 억제 되었다. 이는 광 요소가 송이속 균주의 균사생장에 스트레스 요인으로 작용함을 보여준다. 따라서 균사체의 효율적 배양을 위해서는 암조건 배양이 필요함을 알 수 있었다.

물리적 요인에 따른 최적의 균사생장 조건을 감안하여 화학적 요인에 대한 환경 저항성 실험은 PDA 배지를 기본으로 pH 6으로 산도를 조절하고 25°C 암배양 환경을 기본 조건으로 하고 각 기 첨가된 화학적 요인의 영향을 조사하였다. NaCl 염분 농도 차이로 인한 실험 결과 4종 송이속 균주 모두 1.0% 농도까지는 생장이 가능하였으나 그 이상의 염환경에서의 *T. fulvocastaneum*와 *T. terreum*는 생장을 하지 못하였다(Table. 3). *T. bakamatsutake*는 1.5% 농도까지 성장하였고 *T. matsutake*는 2.0% 염분 환경에서도 생장이 가능함을 보여 내염성이 가장 뛰어난 특성을 보였다. 이러한 결과는 식용의 부후성 담자균인 *Pleurotus ostreatus*가 1.0%의 염분 조건에서부터 균사의 생장이 감소한 연구처럼[11] 외생균근성 송이속 균주 또한 염 조건이 외생균근성 균류에게 스트레스 환경이 될 수 있음을 시사한다. 산림토양에서 Na⁺ 이온은 K⁺, Ca₂⁺, Mg₂⁺ 이온과 같이 4대 양이온으로 불리며 치환성 양이온으로서 토양 내 산도 변화 조절 및 수분 증산 조절, 뿌리 생장 촉진, 광합성에 영향을 미치는 엽록소 구성 등의 역할을 담당한다. 이에 따라 산림의 건전성 평가를 위한 지표로서도 중요한 인자이다. 그러나 산림 서식 버섯류의 안전성과 연계되어 조사된 자료 해석은 거의 없는 실정이다. 따라서 산림에서 토양의 염이 송이버섯류의 자실체 발생에 미치는 정도를 알기 위해서는 다른 이온의 영향에 따른 균사생장 정도는 물론 산림생태적으로 이온치환성과 버섯발생과의 관계에 대한 연구도 병행되어야 할 것이다.

중금속 이온이 존재하는 배지 환경에서 4개 송이속 종은 각 이온 조건마다 다른 형태의 균총과 크기를 보였다(Table 3). 특히 카드뮴(Cd) 이온이 함유된 배지에서 모든 균의 생장이 현저하게 저해되었으며 *T. bakamatsutake*의 경우 균사생장이 전혀 없었다(Table 3). 이러한 결과는 중금속이 인체뿐만 아니라 식물과 균류에 있어서도 독성을 나타내는 것으로 알려진 정보를 뒷받침하는 결과로 보여지나 [12], 같은 외생균근성 균류인 *Suillus luteus*가 카드뮴 중금속에 내성 특성을 가진다는 연구와는 차이를 보였다[13]. 구리(Cu) 이온이 함유된 배지에서는 네 가지 송이버섯류 모두 균사생장이 거의 저해되지 않은 것으로 보아 구리에 대한 저항성을 가지고 있다고 생각된다. 비소(As)가 포함된 배지에서 *T. bakamatsutake*와 *T. fulvocastaneum*는 생장이 많이 저해되거나 자라지 못한 반면에 *T. matsutake*와 *T. terreum*는 거의 저해 받지 않았다. 납(Pb)이 포함된 조건에서는 *T. fulvocastaneum*와 *T. matsutake*는 균사생장이 거의 저해되지 않았으며 *T. bakamatsutake*는 조금 저해되었고 *T. terreum*는 많이 저해 되었다. *T. matsutake*는 아연(Zn)에 대한 저항성이 가장 뛰어났으며 *T. bakamatsutake*와 *T. fulvocastaneum*는 다른 송이속 종에 비해 저항성이 떨어졌다. 이상의 결과 볼 때 이들 4개 송이속 종은 여러 중금속에 대한 내성 정도에 차이가 있음을 알 수 있었다. 근균성이 아닌 균류에 비하여 외생균근성 균류는 카드뮴, 은 같은 중금속을 매우 높은 농도로 함유할 수 있다[14]. 또한 야생버섯에서 중금속이 축적이 된다는 보고가 존재한다[15, 16]. 이에 따라 야생 채취 버섯의 중금속 함유는 식품안전성 견지에서 유해요소를 가지고 있는 바 본 연구에서 얻어진 균사체를 이용 조사한 중금속 내성에 대한 정보는 향후 이들 버섯류의 중금속 오염을 해석하는 기초자료가 될 것으로 생각된다.

살충제 중 일부는 해충 이외에 비특이적으로 미생물에 영향을 끼치는 보고가 있다[17, 18]. 송이속 균주 4종 모두 emamectin benzoate가 첨가된 배지에서 균사생장이 저해 되었다(Table 3). Emamectin benzoate는 살충제이면서 또한 살선충제로서 국내외로 소나무재선충 방제에 효과가 있고 항곰팡이 성 효과가 있는 약제로서 Proclaim®로 상표등록 되어 있어 균사생장 억제를 일으킬 수 있는 것으로

Table 3. Mycelial growth of *Tricholoma* species on PDA supplemented with different chemical factors

Chemical factors	<i>T. bakamatsutake</i>	<i>T. fulvocastaneum</i>	<i>T. matsutake</i>	<i>T. terreum</i>	
NaCl concentration (%)	0.5%	+++	+++	++	++
	1.0%	++	++	+	+
	1.5%	+	-	+	-
	2.0%	-	-	+	-
	2.5%	-	-	-	-
	3.0%	-	-	-	-
	Heavy metal ions	Arsenic (As)	+	-	+++
Cadmium (Cd)		-	+	+	+
Copper (Cu)		+++	+++	+++	+++
Lead (Pb)		++	+++	+++	+
Zinc (Zn)		+	+	+++	++
Pesticides	Abamectin	17.2±0.2	24.4±2.4	33.0±0.9	33.0±0.6
	Acetamiprid	16.0±1.4	19.1±1.2	34.0±3.5	20.4±1.2
	Emamectin benzoate	6.9±1.2	18.9±1.4	25.6±0.5	18.1±2.6
	Thiacloprid	14.9±1.2	11.1±1.1	29.8±4.2	24.7±0.7
	Control	20.8±0.5	20.3±1.7	32.4±1.5	25.6±1.6

PDA, potato dextrose agar; -, no growth; +, 0 to 1/3 length of control growth; ++, 1/3 to 2/3 length of control growth; +++, 2/3 to 3/3 length of control growth.

Mycelia length = mm.

여겨져 왔다[19, 20]. 그러나 본 연구에서와 같은 외생균근성 균류에 대한 독성 연구가 없는 바 향후 확대된 종을 대상으로 저해되는지의 여부와 더불어 어떠한 기작에 의하여 저해되는지에 대한 연구가 필요할 것으로 여겨진다. *T. matsutake*는 emamectin benzoate 외에 다른 세 가지 살충제에 대해선 균사생장 억제제가 거의 나타나지 않았다. *T. fulvocastaneum*는 abamectin 첨가 배지를 제외한 세 가지 살충제 첨가 배지에서 균사생장이 억제된 것을 확인하였다. *T. bakamatsutake*는 네 가지 살충제에 대하여 균사생장이 억제 되었으며 *T. terreum*는 acetamiprid와 emamectin benzoate 살충제 조건에서 균사생장이 억제 되었다. 이러한 결과는 국내 산림에서 해충방제에 사용되는 이들 약제에 대해서 송이속 균주 종 간에 내성이 다름을 보여주는 동시에 지속적인 사용은 이들 버섯의 자연 생산에 지장을 줄 수 있음을 시사한다. 최근 국내에서 내년부터 국내에 사용이 등록되어 있거나 잔류허용기준이 설정된 농약 외에는 사용을 금지하는 농약 허용물질목록 관리제도(Positive List System, PLS)가 시행될 예정이다. 아직 산림에서 버섯 재배에 등록이 되어있지 않은 농약이 버섯에서 검출이 되거나 등록이 되어있어도 잔류허용기준 보다 높게 검출이 되어서는 안되는 것에 대해 기초 자료가 부재한 실정이다. 따라서 산림에서 이들 농약을 사용하고자 할 때에는 버섯균 억제 영향과 버섯균 농약 오염을 동시에 고려해야 할 것이다.

7가지의 세포외효소 활성 검정결과 4종의 송이속 균주 중 활성이 확인된 것은 *T. fulvocastaneum*에서 amylase와 β -glucosidase이었고 *T. bakamatsutake*에서 β -glucosidase가 확인되었다(Table. 4). 이는 이들 송이균류가 식물 세포벽 구성물질에 대해서는 그다지 분해 효소를 잘 분비하지 않는 특성을 가지고 있음을 추측하게 한다. 4가지 버섯 중에 송이인 *T. matsutake*의 경우 다른 3가지 버섯종에 비해 비교적 연구가 더 되어 있어서 GenBank에 cellulase의 존재 유무를 탐색하여본 결과 GenBank locus AB159790가 두 가지의 가설 단백질인 putative cellulase 또는 putative RNA-binding protein partial cds로 탐색되었다. 이는 송이 유전체 상에 cellulose 분해 활성부위가 뚜렷한 cellulase 효소의 유전자 존재가 증명되지 않은 결과이다. 향후 실제 cellulase의 존재 여부를 결정 짓기 위해서는 특정한 조건에서 *T. matsutake*에서 검출된 추정되는 cellulose 유전자의 발현과 효소활성에 대한 검증 연구가 필요하다. 더불어 외생균근은 기주와 공생관계를 형성 하는바 이러한 공생 활동이 이루어지는 과정에서 세포외효소의 활성이 더 두드러질 것으로 기대된다. 따라서 *in vitro*에서 이들 외생균근 송이속 균주로부터 세포외효소 활성을 보기 위해서는 균사체로부터 세포외효소 활성을 유도할 수 있는 시그널이나 유도물질(inducers)을 찾는 연구도 필요하다고 생각된다.

본 연구는 송이속 균주를 이용한 *in vitro* 방법으로 최적 물리적 배양 환경 및 화학적 환경에 대한 내성을 조사함으로써, 다양한 생리 특성과 환경 요인에 따라 강력한 생장저해가 일어나 균사가 사멸하거나 활력을 잃을 수도 있다는 사실이 도출되었다. 따라서 이들 균류를 이용하여 인공배양 시 균사 배양에 유익 또는 유해한 환경조건을 구분 할 수 있어서 향후 배양 연구에 도움이 될 것으로 기대된다.

Table 4. Extracellular enzyme activities of *Tricholoma* spp. on chromogenic media with different substrates

Species	Extracellular enzyme						
	Amylase	Avicelase	CM-Cellulase	β -glucosidase	Pectinase	Protease	Xylanase
<i>T. bakamatsutake</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>T. fulvocastaneum</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>T. matsutake</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. terreum</i>	-	-	-	-	-	-	-

+, Activity detection; -, No detection.

적요

외생균근성 버섯균인 송이(*Tricholoma*)속 균은 현재 인공 재배가 이루어지지 않고 있으며, 성공적인 자원이용을 위해서는 다양한 환경조건에서 균사생장 특성을 규명하는 연구가 선행되어야 한다. 이에 따라 본 연구는 야생버섯 자실체로부터 순수 분리한 4종의 *Tricholoma bakamatsutake* (가송이), *T. fulvocastaneum* (구실갓밤나무송이), *T. matsutake* (송이), *T. terreum* (땅송이)로부터 물리적, 화학적 환경조건에서 균사생장 특성을 조사하였다. 4종 모두 균사생장에 적합한 물리적 환경으로서 최적 배양 환경 조건은 온도가 20~25°C, pH가 4~7, 암 배양 조건인 것을 확인하였다. *T. matsutake*는 30°C에서 균사생장이 멈추는 매우 민감한 특성을 보였다. 균사생장에 미치는 화학적 요소 조사 결과, NaCl 농도조건에서 4종의 *Tricholoma* 모두 1.0% 농도수준 까지 생장이 가능하였다. *T. matsutake*는 2.0% 농도에서도 균사생장이 가능하였다. 중금속인 카드뮴(50 ppm 농도)과 농약인 emamectin benzoate 이 첨가된 배지에서 네 가지 송이속 균의 균사생장이 가장 많이 저해된다는 것을 확인하였다. 중금속 구리(Cu) 이온(50 ppm 농도)이 함유된 배지에서는 4종 송이속 균주 모두 균사생장이 거의 저해되지 않았다. *T. matsutake*는 emamectin benzoate 외에 다른 세 가지 살충제에 대해선 균사생장 억제가 거의 나타나지 않았다. 세포외효소는 *T. bakamatsutake*와 *T. fulvocastaneum*만 발색배지에서 Amylase, β -glucosidase 등의 효소활성을 보였다. 본 연구 결과는 4종 송이속 균주의 균사배양에 적합 또는 유해한 환경조건을 구분 할수 있어서 향후 응용 연구에 도움이 될 것으로 기대된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant (FP 0801-2010-01-2018) from National Institute of Forest Science and National Institute of Horticultural and Herbal Science (PJ01328102), Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Ka KH, Jeon SM, Ryou R, Bak WC, Kang JA, Kim MG, Jeon HS, Jeong YS. Basic culture characteristics of ectomycorrhizal mushrooms. Seoul: National Institute of Forest Science; 2014.
2. Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2008.
3. Ishida TA, Nara K, Hogetsu T. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytol* 2007;174:430-40.
4. Watkinson SC, Boddy L, Money NP. The fungi. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2016.
5. Ka KH, Koo CD. Research questions for artificial cultivation of *Tricholoma matsutake*. *Trends Agric Life Sci* 2002;36:1-6.
6. Jeon SM, Ka KH. Morphological and cultural characteristics of ectomycorrhizal mushrooms. Seoul: National Institute of Forest Science; 2015.
7. Lian C, Narimatsu M, Nara K, Hogetsu T. *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytol* 2006;171:825-36.
8. Kim SH, Uzunovic A, Breuil C. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood using PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:287-90.

9. Kwon HW, Yoon JH, Kim SH, Hong SB, Cheon Y, Ko SJ. Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. *Mycobiology* 2007;35:162-5.
10. Koo NI, Kim YS, Im JH, Choi HT. Development of the monitoring, assessment and management technology for the study of the effect of acidification in forest soil. Seoul: National Institute of Forest Science; 2016.
11. Jhune CS, Sul HZ, Park JS, Kong WS, You YB, Chun SC. Effect of NaCl concentration on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma* spp. *J Mushroom Sci Prod* 2004;2:4-9.
12. Asati A, Pichhode M, Nikhil K. Effect of heavy metals on plants: an overview. *IJAIEEM* 2016;5:56-66.
13. Colpaert JV, Vandenkoornhuyse P, Adriaensen K, Vangronsveld J. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytol* 2000;147:367-79.
14. Cejpková J, Gryndler M, Hršelová H, Kotrba P, Řanda Z, Synková I, Borovička J. Bioaccumulation of heavy metals, metalloids, and chlorine in ectomycorrhizae from smelter-polluted area. *Environ Pollut* 2016;218:176-85.
15. Ndimele CC, Ndimele PE, Chukwuka KS. Accumulation of heavy metals by wild mushrooms in Ibadan, Nigeria. *J Health Pollut* 2017;7:26-30.
16. Demirbaş A. Accumulation of heavy metals in some edible mushrooms from Turkey. *Food Chem* 2000;68:415-9.
17. Walter M, Frampton CM, Boyd-Wilson KS, Harris-Virgin P, Waipara W. Agrichemical impact on growth and survival of non-target apple phyllosphere microorganisms. *Can J Microbiol* 2007;53:45-55.
18. Zhang B, Bai Z, Hoefel D, Tang L, Wang X, Li B, Li Z, Zhuang G. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Sci Total Environ* 2009;407:1915-22.
19. Sanders P, Swan G. Emamectin benzoate. In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, editors. Residue evaluation of certain veterinary drugs. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2014. p. 23-37.
20. Mistretta P, Durkin PR. Emamectin benzoate: human health and ecological risk assessment. Manlius: Syracuse Environmental Research Associates; 2010.